«УТВЕРЖДАЮ»

Ген. директор ЗАО «ДАС»

Бермонт Юрий Александрович.

«___»_____ 2010 г.

М.П.

РУКОВОДСТВО ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

«ДипСтрик BD 912: набор питательных сред *in vitro* для выделения и идентификации микроорганизмов мочевыводящих путей»

Фирма-производитель - «Нова мед Лтд», Израиль

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ДИПСТРИК (DIPSTREAK)
Тест-Система для Бактериологического Экспресс Анализа Мочи

НАЗНАЧЕНИЕ

Дипстрик представляет собой устройство для количественного бактериологического экспресс анализа мочи, обеспечивающий быстрое выявление, количественный учет и идентификацию специфических бактерий в моче[1]. Устройство предназначено для использования в частных врачебных кабинетах и клинических бактериологических лабораториях с целью быстрой диагностики случаев инфекционного воспаления мочевыводящих путей.

ОПИСАНИЕ

Дипстрик представляет собой пластиковую лопатку покрытую с обеих сторон слоем питательной среды (Хромогенный агар и МакКонки агар), вставленную одним концом в завинчивающуюся крышку и помещённую в прозрачную пластиковую пробирку . Пластиковое кольцо с удлиненными зубцами прикреплено к другому концу лопатки так, чтобы над каждой стороной лопатки располагалось по три зубца. Концы зубцов погружаются в контейнер с образцом мочи приблизительно до половины их длины. В процессе возвращения лопатки в исходную пробирку кольцо с зубцами застревает в отверстии пробирки и, поверхности агаров, продвигаясь между концами застрявших зубцов, протирают их, производя таким образом рассев материала по своей поверхности. В результате, с каждой стороны агара, получается серия полосок -штрихов с уменьшающейся бактериальной концентрацией, что позволяет изолировать колонии, даже при высоких концентрациях микроорганизмов в пробе.

Хромогенный агар (UriSelect 3, производства Bio-Rad Laboratories Ltd., USA) представляет собой неселективную питательную среду, применяемую с целью изоляции и количественного учета всех видов микроорганизмов, ответственных за инфекционные воспаления мочевыводящих путей. Обогащенность среды факторами роста определяет ее высокую чувствительность,что обеспечивает рост таких изнеженных микроорганизмов, как стафилококки и стрептококки группы Б. Присутствие хромогенных субстратов определяет панорамный рост микроорганизмов в виде колоний различного цвета в результате демонстрации их специфической ферментативной активности (ß-glucuronidase, ß-glucosidase, tryptophanase и tryptophan deaminase). Благодаря этому, хромогенный агар обеспечивает прямую и окончательную идентификацию таких наиболее частых возбудителей воспалений мочевыводящих путей как *Escherichia coli, Proteus* и стрептококки группы Д. Кроме того, хромогенный агар позволяет ориентировочно диагностировать и другие патогены мочевыводящих путей, в частности представителей кишечной группы бактерий, таких как *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter* и *Serratia*, а также стафилококки и стрептококки группы Б.

Питательная среда МакКонки представляет собой селективную среду обеспечивающую прекрасную дифференциацию между колиформами и лактозо-неферментирующими бактериями, подавляя при этом рост грамположительных микроорганизмов[3]. Большинство бактериальных патогенов мочевыводящих путей прорастают на питательной среде МакКонки, в то время как рост микроорганизмов-загрязнителей подавляется.

Современная рутинная методика лабораторного бактериологического обследования мочи предполагает использование двух признанных методов: традиционный метод посева на чашки Петри[4] и метод Дипслайда[5]. Дипстрик представляет собой комбинацию таких преимуществ этих двух методов, как посев исследуемого материала непосредственно на месте его забора, что исключает чрезмерный пророст бактериальной микрофлоры во время транспортировки образца из поликлиники в лабораторию, быстрое выявление и количественный учет бактерий в исследуемом образце, а также простота и дешевизна методики.

ПРИНЦИП

Стерильные концы зубцов расположенные на свободном от крышки конце лопатки, погружаются в контейнер с образцом мочи приблизительно до половины их длины и захватывают стандартное количество мочи. В процессе возвращения лопатки в исходную пробирку, кольцо с зубцами застревает в отверстии пробирки и, поверхности агаров, продвигаясь между концами застрявших зубцов, протирают их, производя таким образом рассев материала одновременно по обеим поверхностям агара в порядке убывающей концентрации. В результате, с каждой стороны агара, получается серия полосок-штрихов с уменьшающейся бактериальной концентрацией, что позволяет изолировать колонии, даже при высоких концентрациях микроорганизмов в пробе.

Вследствие этого количество посеянных бактерий прямо пропорционально количеству бактерий, присутствующих в образце[6]. После инкубации, количество выросших колоний сравнивается с предоставляемой производителем Таблицей Плотности Бактериального Роста для определения уровня бактериоурии в исследуемом образце мочи.

СОДЕРЖАНИЕ НАБОРА

Дипстрик содержит Хромогенный агар и МакКонки агар.

Хромогенный агар	МакКонки агар (содержание г /литр) :	
Формуляция среды является собственностью производителя (UriSelect 3, Bio-Rad Laboratories, USA).	Пептон	20 г
	Лактоза	10 г
	Желчные соли No.3	1.5 г
	Хлористый Натрий	5 г
	Агар	15 г
	Нейтральный Красный	0.03 г
	Кристаллический Фиолетовый	0.001 г
Конечный pH 7.3 ± 0.2 при 25°C	Конечный pH 7.2 ± 0.2 при 25°C	

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

МАТЕРИАЛЫ, ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ

Дипстрик устройство для Бактериологического Экспресс Анализа Мочи.
Штатив для транспортировки и инкубации.
Реагент Ковача (25-мл бутылочка).

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МАТЕРИАЛЫ

Инкубатор (37 ± 1°C).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для использования в целях диагностики ***In Vitro.***
2. Использовать асептическую технику и установленную лабораторную процедуру для работы и обезвреживания инфекционных материалов.

ХРАНЕНИЕ

1. Хранить Дипстрик при температуре 4-25°C.
2. Предохранять от прямого света для обеспечения стабильности продукции в течение установленного срока годности.

СРОК ГОДНОСТИ

1. Срок годности гарантируется только для продукции при соблюдении всех условий, установленных производителем и исчисляется 4 месяцами при хранении в условиях комнатной температуры 15-25°C и вдали от прямого света или 8 месяцами в холодильной камере при температуре 4-8°C. Дипстрик разрешен к применению до конца срока годности, отпечатанного на крышке и упаковке.
2. Не использовать Дипстрик, проявляющий одно из следующих характеристик: обесцвечивание, обезвоживание или сморщивание поверхности агара, рост микроорганизмов перед использованием или результаты роста, не соответствующие спецификации продукта, согласно процедуре по контролю качества.

СБОР ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Помыть область гениталий и собрать серединную порцию мочи в чистый контейнер. Произвести посев материала как можно быстрее после его сбора. В случае вынужденного хранения материала перед посевом, содержать материал при 4°C в закрытом контейнере не более двух часов.

ТЕХНИКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Одним из важных преимуществ метода Дипстрика является его способность изменять степень своей чувствительности, в зависимости от преследуемых в данном обследовании целей,. Так, при массовых амбулаторных обследованиях, когда диагностической концентрацией бактерий в моче является 10^4-10^5 КОЕ/мл, рекомендуется использовать технику штрихового посева Дипстриком, обеспечивающую порог чувствительности в 10^3 КОЕ/мл.В особых случаях, например у госпитализированных больных и особенно у детей, появляется необходимость в увеличении степени чувствительности метода. В этих случаях рекомендуется использовать технику погружения слайда в образец мочи (метод Дипслайда), обеспечивающую порог чувствительности в 10^2 КОЕ/мл.

А. Метод ШТРИХОВОГО ПОСЕВА (Метод ДИПСТРИКА).

Установить Дипстрик вертикально на ровной поверхности. Одной рукой удерживая пробирку, отвинтить другой рукой крышку и быстрым движением вытащить лопатку (Фиг.1).
Ограничения: *в случаях когда невозможно установить Дипстрик на ровной поверхности, манипуляцию посева можно производить удерживая Дипстрик в руке. Но при этом, следует строго придерживаться одной плоскости при извлечении и вставлении лопатки по отношению к пробирке.*

Удерживая лопатку строго вертикально, погрузить зубцы на несколько секунд в контейнер с пробой мочи, приблизительно до половины их длины, (Фиг.2).
Ограничения: *не прикасаться руками к внутренним стерильным элементам лопатки, пластикового кольца и зубцов, а также к питательным средам!*

Вставить зубцы лопатки в отверстие исходной пробирки Дипстрика (Фиг.3), а затем быстрым, вертикальным и продолжительным усилием (шлепком ладони или ударом
пальца) втолкнуть лопатку в пробирку и ввернуть крышку (Фиг.4).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Отправить засеянный Дипстрик с прикрепленным к нему направлением на анализ в лабораторию для последующей инкубации и дальнейшего исследования. Если немедленная отправка засеянного Дипстрика в лабораторию невозможна, разрешается хранить его в закрытом состоянии при комнатной температуре и вдали от прямого света до первой возможности отправки в лабораторию (до 48 часов).

Ограничения: *не помещать засеянный Дипстрик в холодильную камеру!*

При поступлении в лабораторию, инкубировать Дипстрика в вертикальном положении в течение 18-24 часов при 37°С.

Ограничения: *при помещении в инкубатор желательно открутить крышку Дипстрика на полоборота!*

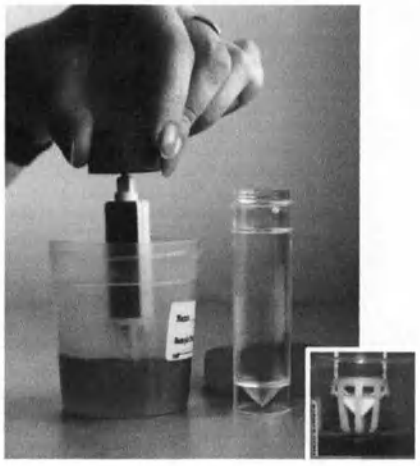
Определить концентрацию микроорганизмов в милилитре пробы сравнивая плотность проросших колоний на каждой стороне агара с приложенным к каждой упаковке Дипстрика и предоставляемой производителем Таблицей (А) Плотности Бактериального Роста при **посеве ШТРИХОВЫМ методом.**

Б. Метод ПОГРУЖЕНИЯ СЛАЙДА В ПРОБУ (Метод ДИПСЛАЙДА).

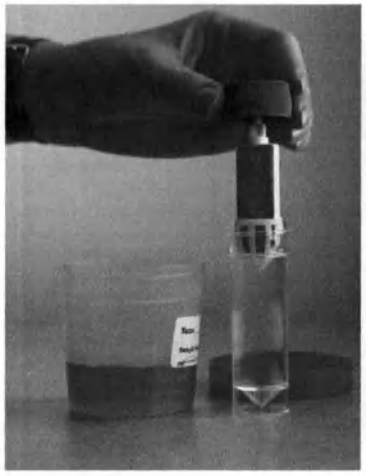
1. Отвинтить крышку Дипстрика и быстрым движением вытащить лопатку.
2. Немедленно вставить зубцы лопатки в отверстие исходной пробирки Дипстрика, а затем быстрым, вертикальным и продолжительным усилием (шлепком ладони или ударом пальца) втолкнуть лопатку в пробирку (для того, чтобы установить зубцы в верхнюю позицию).

Фиг.1

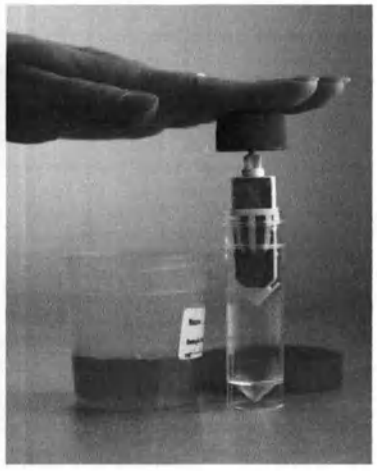
Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4



3. Извлечь лопатку вновь и удерживая строго вертикально, погрузить её на несколько секунд в контейнер с предварительно неразведенной пробой до полного покрытия агара.
   Ограничения: *не прикасаться руками к внутренним стерильным элементам лопатки, пластикового кольца и зубцов, а также к питательным средам!*
4. Извлечь лопатку из пробы, стряхнуть избыток пробы в контейнер, вставить лопатку в пробирку и ввернуть крышку. При ограниченном объёме образца рекомендуется облить две стороны питательных сред до полного их покрытия.
5. Отправить засеянный Дипстрик с прикрепленным к нему направлением на анализ , в лабораторию для последующей инкубации и дальнейшего исследования. Если немедленная отправка засеянного Дипстрика в лабораторию невозможна, разрешается хранить его в закрытом состоянии при комнатной температуре до первой возможности отправки в лабораторию (до 48 часов).
   Ограничения: *не помещать засеянный Дипстрик в холодильную камеру!*
6. При поступлении в лабораторию, инкубировать НоваСтрик в вертикальном положении в течение 18-24 часов при 37°С.
   Ограничения: *при помещении в инкубатор желательно открутить крышку Дипстрика на полоборота!*
7. Определить концентрацию микроорганизмов в милилитре пробы сравнивая плотность проросших колоний на каждой стороне агара с приложенным к упаковке НоваСтрика, Графиком (Б) Плотности Прироста Колоний **методом ПОГРУЖЕНИЯ СЛАЙДА В ПРОБУ**.

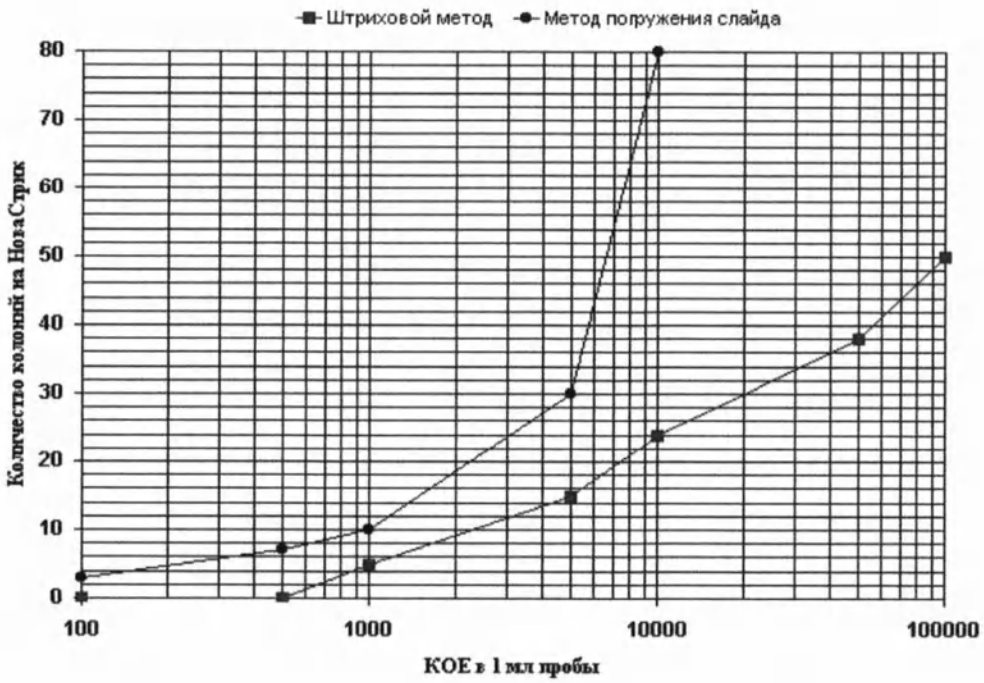
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

РЕЗУЛЬТАТЫ

По окончании последующей инкубации исследовать Дипстрик на наличие бактериального роста, который определяется присутствием колоний на поверхности агара.

Так как образование каждой колонии обусловлено ростом одной материнской бактериальной клетки и в связи с тем, что концы зубцов захватывают только стандартное количество мочи, то количество выросших колоний будет указывать на общую бактериальную обсемененность образца, т.е.на приблизительную концентрацию бактерий в милилитре мочи (Количество Колоне-Образующих Единиц/мл или КОЕ/мл). Культуро-отрицательные образцы могут быть определены и без необходимости открывать Дипстрик, путем прямого просмотра через прозрачный пластмассовый корпус пробирки. При наличии микробного роста, необходимо открыть пробирку Дипстрика, сравнить плотность бактериального роста на поверхности агара с отпечатанной соответствующей Таблицей Плотности Бактериального Роста в зависимости от использованной техники посева и выбрать наиболее похожую иллюстрацию на ней (см. ниже).

График Определения Концентрации Микроорганизмов в Пробах При Посеве на НоваСтрик



РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подсчет бактерий. Как правило, результат теста соответствующий $\geq 10^5$ КОЕ/мл интерпретируется как положительный (выраженный уровень бактериального обсеменения), $\leq 10^4$ КОЕ/мл - как отрицательный, а промежуточный результат между 10^4 и 10^5 КОЕ/мл - пограничным, требующий повторного определения[7,8]. Симптоматические пациенты с результатом посчета бактерий ниже чем 10^5 КОЕ/мл требуют дополнительной оценки, основывающейся на клинической информации[9,10].

Такие факторы как антимикробная терапия, начальная порция мочи и неправильный сбор исследуемого материала могут повлиять на результат подсчета бактерий. В любом случае, только врач может окончательно оценить и правильно интерпретировать результаты, полученные с помощью Дипстрика.

Морфология колоний. Предположительная идентификация основана на типичной морфологии и характерном цвете колоний, особенно на Хромогенном агаре.

Типичная морфология колоний на питательных средах Дипстрика.

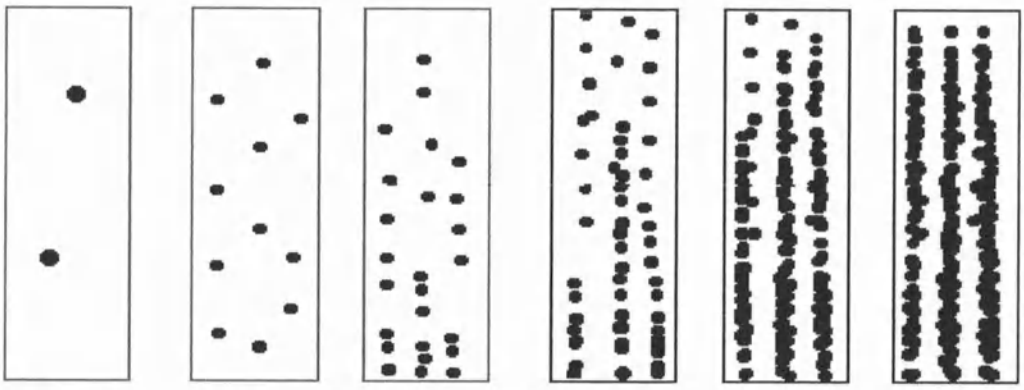
Микроорганизм	Хромогенный агар	МакКонки агар
Escherichia coli	Пурпурно-красные или бесцветные с пурпурно-красным центром	Розово-красные
Klebsiella pneumoniae	Крупные синие или сине-зеленые	Розово-красные
Pseudomonas aeruginosa	Плоские, полупрозрачные, с металлическим блеском	Прозрачные
Proteus mirabilis	Оранжево-коричневые с коричневой окраской среды	Полупрозрачные
Proteus vulgaris	Оранжево-коричневые с коричневой окраской среды	Прозрачные
Staphylococcus aureus	Белые	Нет роста

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Streptococcus agalactiae	Мелкие сине-зеленые	Нет роста
Streptococcus faecalis	Мелкие синие	Нет роста
Candida albicans	Белые	Нет роста

Так как и другие микроорганизмы также растут на этих питательных средах, то полный биохимический анализ и тест на антимикробную чувствительность необходимы для окончательной идентификации.

1. Интерпретация результатов бактериального роста на Хромогенном агаре
(инкубация в течение 18-24 часов при 37°C)

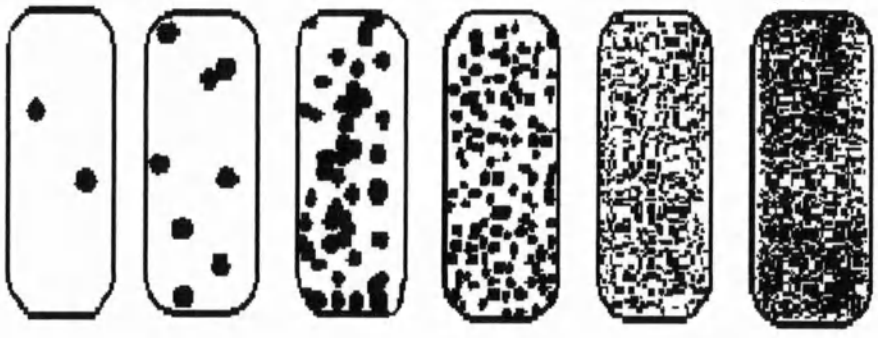


Кол-во колоний <10 10-24 25-50 >50Концентрация микроорганизмов в миллилитре мочи (КОЕ/мл)

Таблица (Б) Плотности Пророста Колоний методом ПОГРУЖЕНИЯ СЛАЙДА В ПРОБУ.

Концентрация микроорганизмов в миллилитре мочи (КОЕ/мл)

10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7



КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Анализ по контролю качества выполняется для каждой серии Дипстрика в процессе его производства. Пользователи продукта, желающие произвести свой собственный анализ качества могут использовать следующую процедуру:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приготовить суспензию каждого из нижеуказанных микроорганизмов в концентрации 10^4 -10^5 КОЕ/мл культуроотрицательной мочи, полученной от здорового индивидума. Подтвердить присутствие микроорганизма в приготовленной коцентрации путем посева 10 микролитров суспензии с помощью калиброванной бактериологической петли на контрольные чашки Петри с питательными средами CLED и МакКонки.
Произвести посев приготовленной суспензии на Дипстрика в соответствии с ТЕХНИКОЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

ТИПИЧНЫЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

после 18-24 часов инкубации при 37°C

Микроорганизм	**Штамм ATCC®**	**Хромогенный агар**	**МакКонки агар**
Escherichia coli	25922	Пурпурно-красные или бесцветные колонии с пурпурно-красным центром	Розовые колонии
Staphylococcus aureus	25923	Белые колонии	Рост подавлен
Streptococcus faecalis		Мелкие синие колонии	Рост подавлен
Proteus mirabilis	12453	Оранжево-коричневые колонии с коричневой окраской среды	Полупрозрачные, бесцветные колонии

Если Дипстрик не обеспечивает ожидаемого роста микроорганизмов, то он не соответствует требованиям качества и не подлежит использованию.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Использование Дипстрика обеспечивает только приблизительные результаты. Если врач заключает, что полученные результаты имеют клиническое подтверждение, то полная биохимическая идентификация возбудителя и тест на антимикробиальную чувствительность должны быть выполнены.
Дипстрик способен обнаруживать бактериальные концентрации в моче не ниже чем 100 КОЕ/мл. Таблица Плотности Бактериального Роста позволяет произвести количественный учет бактерий с точностью до 1 LOG (x10). При правильном использовании, Дипстрик показывает 97% корреляцию в сравнении с традиционным методом подсчета колоний на чашках Петри с питательной средой.
При смешанном бактериальном росте, т.е. при наличии нескольких видов микроорганизмов, рекомендуется повторить анализ из-за высокой вероятности внешнего загрязнения исследуемого материала.
Дети и определенные больные с истинной инфекцией могут показывать результаты количественного учета ниже чем 10^5 КОЕ/мл. Окончательная интерпретация таких результатов должна быть проведена на основе клинических данных. Деятельность частных лабораторий должна быть основана на тесной связи между лечебным и лабораторным персоналом. Руководством для работы служит принцип, что четыре фактора (количество выделенных микроорганизмов, плотность микробиального роста, вид исследуемого материала и клиническая информация) должны быть рассматрены для окончательной оценки значимости выделенных микроорганизмов. Клиническая информация может потребовать от врача изменить окончательную интерпретацию результатов бактериологического исследования мочи.
При высоких концентрациях микроорганизмов в пробах мочи (10^7 КОЕ/мл и выше), как правило, обнаруживается их сливающийся рост без четкой изоляции отдельных колоний. В подобных случаях необходимо вернуться к стандартному методу подсчета микроорганизмов в культуре мочи с использованием чашек Петри с питательной средой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yagupsky, M.Rader, N.Peled 2000. Clinical evaluation of a novel chromogenic agar dipslide for diagnosis of urinary tract infection. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19: 694-698.
2. The Oxoid Manual, 7th Edition. 1995. Oxoid Unipath, Basingstoke, England. 2-75: 2-76
3. The Oxoid Manual, 7th Edition. 1995. Oxoid Unipath, Basingstoke, England. 2-144:2-145.
4. Degre, M. 1970. Quantitative and semiquantitative methods for detection of bacteriuria. Translated from Tidsskrift for Den norske laegeforening 90: 27-30.
5. McAllister, T.A. 1973. The day of the Dipslide. Nephron 11:123-133.
6. Mackey, J.P. and G.H. Sandys. 1965. Laboratory diagnosis of infections of the urinary tract in general practice by means of Clinical Microbiology, Washington, D.C.of a dip-inoculum transport medium. British Medical Journal. 2:1286-1288.
7. Kass, E.H. 1957. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract. Arch. Int. Med. 100:709-714.
8. Berger, S.A., B. Bogokowsky, and C. Block. 1990. Rapid screening of urine for bacteria and cells by using a catalase reagent. J. Clin. Micro. 28:1066-1067.
9. Clarridge, J.E., M.T. Pezzlo, and K.L. Vosti. 1987. Laboratory diagnosis of urinary tract infections. In Cumitech 2A. American Society for Microbiology, Washington D.C.
10. Isenberg, H.D. and R.F. D'Amaato. 1985. Indigenous and pathogenic microorganisms of humans, p. 30-31. In E.H. Lennette, A. Ballows, W.J. Hausler, Jr., and H.J. Shadomy, Manual

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7листов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU